

· 论 著 ·

## HPV L1 C-末端保守序列多肽免疫学特性的探讨\*

蒋雪梅,肖长义<sup>△</sup>,吴江峰,李红军,袁太宁,汤桂成

(三峡大学医学院,湖北宜昌 443002)

**摘要:**目的 探讨一段位于人乳头状瘤病毒(HPV)L1 C-末端、长 30 个氨基酸残基的保守序列的免疫学性质而进行此实验。方法 以此序列为基础人工合成多肽加氢氧化铝佐剂免疫小鼠。取免疫鼠脾脏制备脾细胞悬液,流式细胞术检测小鼠脾脏中 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞数量,计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值。四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖。取培养上清液以双抗体夹心法 ELISA 检测细胞因子 IL-4、IFN- $\gamma$  的含量。结果 (1)脾细胞 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞数量、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值比阴性对照组明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );(2)T 细胞增殖实验结果未见明显差异( $P > 0.05$ );(3)细胞因子 IL-4 含量较对照组显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。IFN- $\gamma$  含量与对照组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。结论 结果表明多肽诱导体液免疫效果是肯定的,有作为预防性疫苗进一步研究开发的前景;多肽的细胞免疫原性可能较弱,未能诱导与细胞免疫相关的反应,多肽的免疫原性还有待于进一步改进提高。

**关键词:** HPV;晚期蛋白;保守序列;免疫原性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)01-0012-04

To investigate the immunity characteristics of a conserved sequence on the C terminal region of the human papillomavirus major protein L1\*

Jiang Xuemei, Xiao Changyi<sup>△</sup>, Wu Jiangfeng, Li Hongjun, Yuan Taining, Tang Guicehng

(Medical College of Sanxia University, Yichang, Hubei 443002, China)

**Abstract:** Objective To investigate and detect the immunity characteristics of a conserved sequence including 30 amino residues which is located in the C terminal of HPV L1. **Methods** The immune model of mouse was establish with a polypeptide synthesized based on this sequence. The amount of CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocyte of the mouse spleen was detected by Flow cytometry, then the value of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were calculated. The cell proliferation was detected by MTT assay. Sample was took from the cell supernatant to detect the content of IL-4 and IFN- $\gamma$  by double antibody sandwich ELISA. **Results** (1)The amount of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes and the value of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were significantly increased than control group ( $P < 0.05$ ). (2)The result of T cell proliferation showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). (3)The level of IL 4 were significantly higher than that of control group ( $P < 0.01$ ). The content of IFN- $\gamma$  level showed no significant difference compared with control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The results showed that it was affirmative that the polypeptides induced humoral immunity, which was worth to be furtherly studied as a preventive vaccine. But its cell immunogenicity is weak, and the attempt to induce the response related to the cell immunogenicity was failed, and the immunogenicity of the peptide remains to be improved.

**Key words:** HPV; late protein; conserved sequence; immunogenicity

宫颈癌为妇女最常见的肿瘤之一,世界卫生组织的统计资料表明,在全球妇女癌症病死率中宫颈癌位居第 2 位,一些发展中国家甚至居于首位<sup>[1]</sup>。人乳头状瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染与宫颈癌发展密切相关<sup>[2]</sup>,目前已发现 HPV 有 100 多个型别。而现今临床使用的宫颈癌预防性 HPV 疫苗最多能够预防的型别只有 4 个型别<sup>[3-4]</sup>。因此,研究广谱疫苗是有效预防宫颈癌的关键。前期课题组在 HPV L1 蛋白的 C 末端找到了一段能够诱导产生多型别反应能力抗体的多肽序列。为进一步了解此多肽序列的免疫学特性,进行了此研究,现将结果报道如下。

**1 材料与方**

**1.1 特异性肽段的确定、合成及抗多肽抗血清的制备** HPV L1 共同表位特异性区段的氨基酸残基序列通过文献、软件,以及对 HPV16 L1 蛋白三维结构分析确定<sup>[5-7]</sup>,序列以 HPV16 L1 C-末端 aa448~477 区段高度保守的序列为基础,对个别氨

基酸残基进行了置换,序列为:EVNLKEKFSADLDQF-PLARKFLLQAGLKAK。特异性肽段委托北京赛百盛基因技术有限公司在美国 Genemed Synthesis Inc. 公司用常规方法合成。将合成多肽以磷酸盐缓冲液(PBS)溶解后,1:1 加氢氧化铝佐剂,超声乳化,直至成均匀乳状分别以 50  $\mu$ g 多肽剂量免疫 Balb/c 小鼠,共免疫 3 次。于第 3 次免疫后 10 d,即实验的第 40 天处死小鼠,采集标本进行相关检测。

**1.2 免疫试剂** 山羊抗小鼠 IgG-HRP 免疫球蛋白、山羊抗兔 IgG-HRP 免疫球蛋白,北京中杉生物金桥公司。Rat anti-mouse CD3、4、8 荧光单抗,美国 Caltag 生物技术公司。小鼠 IL-4、IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒,美国 R&D 生物技术公司。噻唑蓝(MTT),Sigma 公司。

**1.3 多肽免疫原性的检测**

**1.3.1 血清中抗体效价 ELISA 检测** 于实验的第 40 天摘除小鼠眼球采血,4  $^{\circ}$ C 放置 2 h, 5 000 r/min 离心 10 min,收集血

清,小计量分装,-80℃保存备用。用间接 ELISA 法检测血清抗体 IgG 的滴度,具体方法如下:聚苯乙烯酶标板每孔分别加入稀释的多肽 0.1 μL(含量为 0.1 μg),加碳酸缓冲液 100 μL 包被,洗板,封闭;洗板;多肽抗血清按 1:100,1:200,1:400……1:6400 用 PBS 稀释,加入每孔 0.1 mL,设空白对照和阴性对照(鼠抗 IgG);洗板;每孔分别加入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体,洗板;加入二氨基邻苯二胺显色液室温避光显色 15 min,以 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,酶标仪 490 nm 读取各孔光密度(optical density,OD)值。重复实验 3 次取平均值。

**1.3.2 FCM 检测 CD3<sup>+</sup>,CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>,CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>** 小鼠取血后断颈处死,75%酒精浸泡消毒,无菌完整剥离脾脏,按常规机械法制备单细胞悬液,PBS 离心洗涤,调整细胞浓度使成 3×10<sup>7</sup>/mL。取脾细胞悬液 50 μL/Test,严格按抗体说明书要求加入适当试剂量(Hamster Anti-Mouse CD3-FITC,IgG1-FITC,Rat Anti-Mouse CD4-PE,CD8-PE,IgG2a-PE),室温暗处避光反应 20 min。免疫标本制备仪溶血,于 1000 r/min 离心 5 min,2 次 PBS 洗涤,0.5 mL PBS 重悬沉淀,上机分析(EPICS XL-4 型流式细胞分析系统)。

**1.3.3 四甲基偶氮唑盐(tetrazolium,MTT)法检测淋巴细胞增殖情况** 取得的另一部分脾细胞悬液,离心弃上清液。用 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 溶解红细胞,然后离心得细胞沉淀,用 2 mL Hanks 液悬浮后加在 2 mL 的淋巴细胞分离液面上,离心后取两者界面上的细胞获得淋巴细胞,将细胞加入 96 孔 U 型培养板、脾细胞 100 μL 及 1640 培养基,实验孔加入免疫相应多肽,阳性对照孔加入 ConA 10 μL/孔。培养 68 h,加 MTT,继续孵育 4 h,弃上清液,加二甲基亚砜(DMSO)200 μL/孔,振荡混匀,使结晶物充分溶解,10~30 min 内读值。比色:在酶标仪上测定吸收值 A,记录结果。

**1.3.4 双抗体夹心 ELISA 法检测 IL-4、IFN-γ 细胞因子 T**

细胞增殖实验中,将制备的脾脏单个细胞悬液,加入平底 96 孔细胞培养板,100 μL/孔。然后分别加入不同浓度多肽、PBS,每个相同浓度做 3 复孔。于 5%CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养 68 h。培养结束取出每孔培养物的上清液,分装于 EP 管中-80℃备用,待做细胞因子 IL-4、IFN-γ 检测。严格按试剂说明书的双抗体夹心 ELISA 法步骤:取出所需板条,除空白孔外,分别将标本或不同浓度标准品(100 μL/孔)加入相应孔中,封住反应孔,孵育;洗板;除空白孔外,加入生物素化抗体工作液(100 μL/孔)封住反应孔,孵育;洗板;除空白孔外,加入酶结合物工作液(100 μL/孔)封住反应孔,孵育;洗板;加入显色剂,避光孵育 10~15 min;加入终止液,混匀后即刻测量 OD 450 nm 值(5 min 内)。绘制标准曲线,并根据绘制的标准曲线计算出样品 IFN-γ 和 IL-4 含量。

**2 结果**

**2.1 多肽免疫原性的确定**

**2.1.1 ELISA 检测** 多肽免疫鼠血清抗体 IgG 滴度测定以 0.5 μg/L 浓度的多肽免疫鼠,可检测到血清内有较高滴度的 IgG 抗体活性,滴度在 1:600 左右。可以看出多肽免疫是成功的(图 1)。为进一步研究多肽的免疫原性提供了基础。

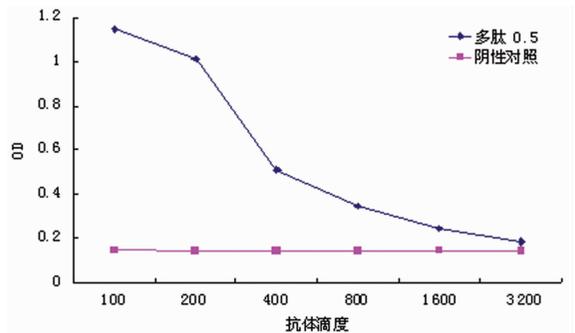


图 1 0.5 μg/L 多肽免疫小鼠后血清中抗体滴度

表 1 0.5 μg/μL 的多肽免疫小鼠后对脾脏中 T 细胞亚群的影响(̄x±s,n=6)

| 组别          | CD3 <sup>+</sup> (%) | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> (%) | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> (%) | CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> |
|-------------|----------------------|--|--|------------------------------------|
| 0.5 μg/μL 组 | 40.78±2.63           | 30.98±2.52*  | 11.95±0.67   | 2.59±0.35*                         |
| PBS 组       | 37.70±1.90           | 26.30±1.73   | 14.20±2.33   | 1.86±0.17                          |

\*:P<0.05,与 PBS 组比较。

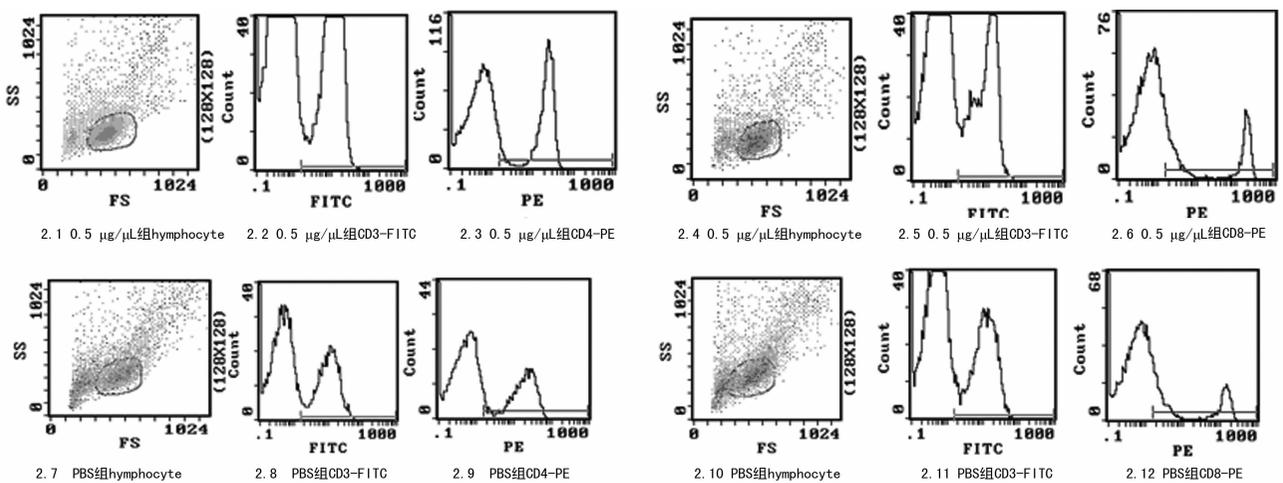


图 2 流式细胞图

**2.1.2 FCM 检测** 0.5 μg/μL 浓度多肽组能提高 CD3<sup>+</sup>

CD4<sup>+</sup> 细胞数量及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值,与 PBS 组结果相比差异有

统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见表 1。流式细胞图见图 2。

**2.1.3 多肽免疫鼠脾细胞悬液 T 细胞增殖实验 MTT 检测结果** 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  多肽免疫组鼠脾细胞悬液 T 细胞增殖实验结果发现,多肽免疫鼠体外 ConA 刺激与 PBS 结果相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  浓度多肽刺激与 PBS 结果相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PBS 免疫鼠体外 ConA 与 PBS 结果相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而多肽与 PBS 结果相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见表 2。

表 2 多肽免疫小鼠后 T 淋巴细胞增殖结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别                             | 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (免疫)组 | PBS 组                            |
|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| PBS(刺激)                        | 0.783 41 $\pm$ 0.023 57             | 0.794 74 $\pm$ 0.055 53          |
| 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$    | 0.823 35 $\pm$ 0.047 63             | 0.767 38 $\pm$ 0.090 36          |
| 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  | 0.793 58 $\pm$ 0.057 21             | 0.805 33 $\pm$ 0.027 80          |
| 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | 0.654 43 $\pm$ 0.074 21             | 0.728 16 $\pm$ 0.010 88          |
| ConA                           | 0.983 31 $\pm$ 0.063 22 $\Delta$    | 1.068 20 $\pm$ 0.014 01 $\Delta$ |

$\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与 PBS 比较。

**2.1.4 双抗体夹心 ELISA 检测** 小鼠脾细胞悬液体外刺激后测定 IL-4、IFN- $\gamma$  水平。按试剂盒说明书分别绘制 IL-4、IFN- $\gamma$  标准曲线。各试验组的实测值与之比较,算出对应的含量。(1)IL-4 含量的检测结果 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  浓度多肽免疫鼠脾细胞悬液体外经 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  多肽刺激后,培养上清液测得 IL-4 的含量(33.888 $\pm$ 4.902) pg/mL 比 PBS 阴性对照组(13.254 $\pm$ 4.244) pg/mL 明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  组的小鼠 IL-4 的含量可以达到 30 pg/mL 以上。(2)IFN- $\gamma$  的含量检测结果。0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  浓度免疫的鼠脾细胞悬液体外经(1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )多肽刺激后,IFN- $\gamma$  的含量(10.667 $\pm$ 4.937) pg/mL 与阴性对照组结果(10.546 $\pm$ 4.244) pg/mL 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨 论

HPV 是宫颈癌的主要致病因子,宫颈癌在全球发病率高。应用疫苗进行防治不仅可以预防病毒感染,且可降低此类病毒感染相关的恶性肿瘤的发生,具有十分重要意义。为了有效预防这类病毒的感染和传播,世界各国都在开展大量 HPV 疫苗的研究,发展 HPV 疫苗成为人们关注的焦点<sup>[8]</sup>。迄今为止,HPV 疫苗的研制已取得突破性进展,第一个由 Merck 公司生产的预防性 HPV 疫苗已经上市,但大都针对高危型别。由于 HPV 型特异性很强,型间很少有交叉反应,所以针对多型 HPV 的预防性疫苗的研究,可有效控制与其有关的疾病的传播与发生,降低由其引起的恶性肿瘤的发生率。但由于对 HPV 感染细胞的免疫标志物了解太少,加之表位多肽的免疫原性较弱,难以刺激有效而强烈的免疫应答,使其进展缓慢。

本研究利用前期筛选的一段位于 HPV L1-C 末端 aa448~477 区段的高度保守的长 30 个氨基酸残基的序列<sup>[9]</sup>进一步探讨这段人工合成多肽的免疫原性,并且在前期研究中已证实该序列在体液免疫中具有多价性<sup>[10-12]</sup>,为探索这段 L1 多肽有可能作为广谱疫苗研发奠定一定的基础。

免疫应答必须要有抗原的刺激,资料表明测定淋巴细胞体外增殖反应是检测细胞免疫功能的基本方法之一,通过测定此时淋巴细胞增殖情况就可间接反映由疫苗诱导的特异性细胞免疫应答的情况。本实验通过 MTT 法对接受多肽免疫注射后的小鼠脾细胞进行 T 淋巴细胞增殖实验测定与 PBS 结果相

比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。多肽 T 淋巴细胞增殖反应不明显可能与该多肽的细胞免疫原性很弱有关或不含 T 细胞表位。

T 细胞是构成机体免疫系统的主要细胞群体之一,T 细胞在免疫调节中决定免疫应答的类型,协调细胞免疫和体液免疫之间的关系。根据 T 细胞表面 CD4 和 CD8 分子表达情况,可将成熟的 T 细胞分为 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞。CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的浸润,使得病变组织退变消失,其细胞免疫机制包括直接杀伤、局部释放细胞因子、提高机体的免疫力、感染区免疫活性细胞的吞噬和杀伤功能的恢复<sup>[13]</sup>。故检测 T 细胞亚群对了解宿主体内的免疫功能有重要作用。本实验流式细胞术测定结果多肽免疫的鼠脾组织 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞数量和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值均比阴性对照组高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),人们发现 CD4<sup>+</sup> Th 细胞在肿瘤免疫中能对 CD8<sup>+</sup> T 细胞和 B 细胞起重要的辅助作用。CD4<sup>+</sup> 可增强 CTL、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和抗体依赖的抗肿瘤免疫效应等,发现通过免疫产生的特异 CD4<sup>+</sup> Th 细胞能增加 CD8<sup>+</sup> T 效应细胞介导的抗肿瘤反应,甚至当肿瘤细胞是 MHC II 阴性时也起作用<sup>[7]</sup>。Ligia 使用流式细胞仪定量测定结合到 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞 DNA 上的 BrdU,发现 HPV16、18、31、53 L1 VLP 受试者接种 HPV16 L1 VLP 后 CD4<sup>+</sup> T 细胞的反应水平比 CD8<sup>+</sup> T 细胞要高<sup>[14]</sup>。本实验结果说明,该保守序列多肽可以诱导机体升高 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 细胞数量和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值。而多肽免疫组小鼠 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞数水平变化不明显,说明该多肽在诱导特异性 CTL 反应、清除 HPV,及杀伤 HPV 相关肿瘤细胞还需进一步研究。

细胞因子在低浓度下发挥作用,是机体发挥免疫功能不可缺少的成分。以多肽免疫鼠脾细胞悬液,体外经多肽刺激后,细胞因子 IL-4 的含量与对照组的相比显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),IL-4 的含量可达到 30 pg/mL。而细胞因子 IFN- $\gamma$  的含量与对照组的相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。该结果与刘方<sup>[15]</sup>研究的 HPV 6B 亚型 L1 重组质粒的构建及免疫原性分析的报道一致,他发现 L1 重组质粒免疫组小鼠的脾淋巴细胞在体外经 L1 蛋白刺激后 IL-4 分泌增加。曹伟<sup>[16]</sup>在研究四段候选多肽的免疫学效应时,在分别免疫小鼠第 6 周后,体外也诱导出了细胞因子 IL-4 的产生。CD4<sup>+</sup> Th 亚类细胞:Th1 和 Th2,分别在 IFN- $\gamma$ , TNF 和 IL-4,-5,-6,-10 等细胞因子的诱导表达下支持细胞免疫和抗体应答。IL-4 是 B 细胞生长因子,可以促使产生大量的抗体。IL-4 也可诱导 IgG<sub>1</sub> 和 IE 基因产生 IgG<sub>1</sub>, IgE 与嗜碱性粒细胞、巨噬细胞上 FcER 受体的上调作用相关。关于 IFN- $\gamma$  的抗病毒作用机制,主要还是免疫调节起主要作用,Oh 等<sup>[14]</sup>把不同型 HPV16、18、31、53 的 L1 VLP 分别肌肉注射到健康年轻女性后,接着接种 HPV16 L1 VLP,然后检测到接种前后淋巴细胞增殖反应的变化和细胞因子(IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-5)升高。本实验结果发现,多肽体外刺激可以提高产生 IL-4 的含量,而 IFN- $\gamma$  的含量不高,说明多肽通过产生细胞因子调节机体的免疫功能可能是以体液免疫为主。本研究由于测定的细胞因子是在体外脾细胞悬液受多肽刺激后产生的,所以需要进一步研究该序列多肽产生细胞因子调节机体的免疫功能途径,后续研究可以通过测定胞内细胞因子的分泌进一步说明。

## 参考文献:

- [1] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus type 2 and invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(1): 63-73.
- [2] Sytse J, Piersma. Immunosuppressive tumor microenvironment in cervical cancer patients[J]. *Cancer Microenviron*, 2011, 4(3): 361-375.
- [3] Fraser C, Tomassini JE, Xi L, et al. Modeling the long-term antibody response of a human papillomavirus(HPV) virus-like particle (VLP) type 16 prophylactic vaccine [J]. *Vaccine*, 2007, 25(21): 4324-4333.
- [4] Stanley M. Immune responses human papillomavirus[J]. *Vaccine*, 2006, 24(Suppl 1): S16-S22.
- [5] Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Chapter 12: Prophylactic HPV vaccines: Underlying mechanisms [J]. *Vaccine*, 2006, 24(S3): 106-113.
- [6] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens[J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11(9): 115-119.
- [7] Fraser C, Tomassini JE, Xi L, et al. Modeling the long-term antibody response of a human papillomavirus(HPV) virus-like particle (VLP) type 16 prophylactic vaccine [J]. *Vaccine*, 2007, 25(21): 4324-4333.
- [8] Christophe FA, Joanne E, Tomassini B, et al. Modeling the long-term antibody response of a human papillomavirus(HPV) virus-like particle (VLP) type 16 prophylactic vaccine[J]. *Vaccine*, 2007, 19(25): 4324-4333.
- [9] Zwaveling S, Ferreim Mota SC, Nouta J, et al. Established human papillomavirus type 16 expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides [J]. *J Immunol*, 2002, 169(1): 350-358.
- [10] 姜波玲, 肖长义, 叶红. HPV L1 共同表位多肽多价性的临床标本检测[J]. *肿瘤*, 2008, 28(10): 864-868.
- [11] 姜波玲, 肖长义, 叶红, 等. 一种多价的 HPV L1 短肽抗血清用于多型 HPV 阳性临床标本筛查的初步探讨[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(4): 746-748, 794.
- [12] 薛冰, 肖长义, 叶红. 毒多肽疫苗临床研究现状[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(11): 1050-1053.
- [13] Malejczyk J, Majewski S, Jablonska S, et al. Cellular immunity in cutaneous and genital HPV infections[J]. *Clin Dermatol*, 1997, 15(2): 261-274.
- [14] Oh K, Sohn T, Park JS, et al. Enhanced mucosal and systemic immunogenicity of human papillomavirus-like particle encapsidating interleukin-2 gene adjuvant [J]. *Virology*, 2004, 328(2): 266-273.
- [15] 刘方. HPV6b 亚型 L1 重组质粒的构建及免疫原性的分析[J]. *临床皮肤科杂志*, 2004, 33(2): 69-72.
- [16] 曹伟. 基于 HPV6、11 之 L1 蛋白表位多肽疫苗的设计及其免疫学效应研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2004.
- (收稿日期: 2013-08-14 修回日期: 2013-09-09)
- 
- (上接第 11 页)
- [6] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B[J]. *J Hepatol*, 2012, 57(1): 167-185.
- [7] 喻剑华, 施军平, 武进, 等. 拉米夫定和阿德福韦酯初始联合与恩替卡韦单药治疗慢性乙型肝炎的疗效和安全性比较[J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(2): 88-92.
- [8] 王世其. 拉米夫定联合阿德福韦与恩替卡韦单药对慢性乙型肝炎初治患者的疗效比较[J]. *山东医药*, 2011, 51(20): 100-101.
- [9] 姚仲彩. 拉米夫定联合阿德福韦酯与恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎疗效比较[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2010, 37(5): 309-311.
- [10] Wang LC, Chen EQ, Cao J, et al. De novo combination of lamivudine and adefovir versus entecavir monotherapy for the treatment of naive HBeAg-negative chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatol Int*, 2011, 5(2): 671-676.
- [11] Carey I, Mendes A, Joshi D, et al. Long-term de-novo lamivudine plus adefovir combination therapy in chronic hepatitis B is efficient, but has negative impact on renal/bone safety in comparison to entecavir monotherapy[J]. *J Hepatol*, 2011, 54: s284.
- [12] Lok AS, Lai CL, Leung N, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1714-1722.
- [13] Liaw YF, Gane E, Leung N, et al. 2-Year GLOBE trial results: telbivudine is superior to lamivudine in patients with chronic hepatitis B [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(2): 486-495.
- [14] Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B [J]. *Hepatology*, 2008, 48(3): 750-758.
- [15] Hadziyannis S, Tassopoulos N, Heathcote E, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(6): 1743-1751.
- [16] Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1503-1514.
- [17] Ayoub WS, Keeffe EB. Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 28(2): 167-177.
- (收稿日期: 2013-08-23 修回日期: 2013-09-21)